



油脂酸化安定性におよぼすクロロフィル類の影響に関する研究

著者	遠藤 泰志
号	350
発行年	1985
URL	http://hdl.handle.net/10097/16009

氏 名 (本籍)	えん 遠 どう 藤 やす 泰 し 志
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 350 号
学位授与年月日	昭和 61 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学 位 論 文 題 目	油脂酸化安定性におよぼすクロロフィル 類の影響に関する研究

論文審査委員 (主 査)

助教授 藤本健四郎	教授 安 元 健
	教授 目 黒 熙

論文内容要旨

緒言

クロロフィル (Chl) は、高等植物、シダ類、藻類およびバクテリアなど広範囲に分布しており、光合成の初期過程で重要な役割をなしていることはよく知られた事実である。また Chl は、野菜の鮮度や加工食品の品質を評価する上で、その指標に用いられており、Chl の持つ新鮮な緑色をいかに長く保持するかに苦心が払われている。一方、植物油脂中にも Chl は微量成分として存在しており、油脂の酸敗と関係があるのではないかと疑問がもたれていた。しかし、Chl に関する研究は、光合成に関係した生化学的分野やフェオホルバイドのような光過敏症を引き起こす Chl 分解物を対象とした食品衛生的または、薬理学的分野での研究が主たるもので、Chl と油脂の酸化との関係に触れた研究は極めて少なかった。近年、Chl が光存在下で一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) を発生して、自動酸化とは異なったメカニズムの酸化を引き起こすことが知られるようになり、 $^1\text{O}_2$ の酸化で生成する各種の脂質過酸化物についても検討されるようになってきた。ただし、植物油脂中に存在する Chl の種類や量についての研究は依然として少なく、油脂中での Chl の挙動や油脂中にどの位残存し、また残存レベルの Chl 類が油脂の酸化安定性にどのように関与しているのかなど不明の点が多い。

一方、著者の研究室では、最近、従来の比色定量法よりも感度の優れた Chl の蛍光定量法を開発して、食用油脂中に存在する程度の微量な Chl および Chl からマグネシウムのはずれたフェオフィチン (Phy) (Fig. 1) を測定するのに成功した。そこで本研究では、この Chl の蛍光定量法を他の方法と併用することにより、油脂および油脂系食品における Chl の挙動や植物油脂中に存在する Chl およびその分解物の油脂酸化安定性におよぼす影響について系統的な検討を行った。

第1章 植物油脂中に存在するクロロフィル (Chl) 類の検索

ナタネ (カナダ産 Canola 種) 粗原油を試料として、カラムクロマトグラフィーで緑色色素区分を分取した後、その吸収スペクトル、薄層および高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。その結果、緑色色素の主成分は、Chl の分解物の一つである Phy (a および b) であることが明らかとなった。(Fig. 2) 一方、Chl そのものは微量しかなく、光過敏症の原因物質であるクロロフィルドやフェオホルバイドの存在は認められなかった。

さらに、当研究室で開発した Chl の蛍光定量法を各種の精製食用油脂に応用した結果数 $10 - 100 \mu\text{g/Kg oil}$ の Chl 類が含まれていること、および Chl と Phy の比率は油脂の種類に関係なくほぼ一定で、Phy a が Chl 関連色素の約 70% 以上を占めることが観察された。(Table 1)

一方、Phy が多量に油脂中に存在する理由を明らかにするため、ナタネを試料に用いて、これ

から各種溶剤で油を抽出するとともに、精製の各工程における油脂中の色素の組成の変化を調査した。その結果、*n*-ヘキサンのような非極性溶媒で抽出した油脂中にはPhyが多く存在しており、逆に極性溶媒による抽出油中にはChlが多く含まれていることが明らかとなった。また、精製過程の中で脱ガム操作が、油脂中のChlをPhyに変化させることを見出し、植物油脂中のChlの組成は、油糧種子からの抽出および精製方法に依存することが明らかとなった。

第2章 光存在下におけるChl類の酸化促進作用

リノール酸メチルにChlを添加した後、濃度・温度・光量を変えて光酸化を行った結果、Chlに酸化促進作用の有することを認めるとともに、その作用は酸化条件（特に光量）に依存することを明らかにした。（Table 2）

Chlの分解物であるPhyおよびフェオホルバイドの酸化促進作用を比較検討したところ、これらのChl分解物にChl以上の強い酸化促進作用が観察された。（Fig. 3）また、*a*-typeと*b*-typeとを比較した場合、*b*-typeに強い効果が観察された。この結果はトリグリセリドを基質油とした場合でも同様であり、食用油中に残存する程度でもChl類に酸化促進作用のあることを認めた。（Fig. 4）

ChlおよびPhyの酸化促進作用の機構を明らかにするため、各種活性酸素スクャベンジャーの添加効果を調べるとともに、ChlおよびChl誘導体・構成成分を添加した際のリノール酸メチルの光酸化生成物をGC-MS分析法を用いて比較検討を行なった。その結果、Fig. 5に示すように、 $^1\text{O}_2$ のクエンチャーである β -カロチンや α -トコフェロールの添加により、ChlおよびPhyの酸化促進作用は著しく阻害された。また光酸化後のChlおよびPhy添加リノール酸メチル中に、自動酸化では生成しないが、 $^1\text{O}_2$ 酸化で生成する非共役ジエン系モノヒドロペルオキシドの存在が確認された。さらにポルフィリン化合物に酸化促進作用と $^1\text{O}_2$ 発生（Table 3）が認められたことから、ChlおよびPhyの酸化促進作用は、主として $^1\text{O}_2$ の発生によるものであり、その活性は、ポルフィリン骨格に存在することが明らかとなった。

次に、Chlの酸化促進作用に対する α -トコフェロールおよび β -カロチンのような油脂中に不ケン化物として共存する微量成分の影響について検討した。その結果、 α -トコフェロールおよび β -カロチンはいずれもChlの酸化促進作用を減少させるとともにChlの分解を抑制した。

第3章 暗所下におけるChl類の抗酸化作用

ChlおよびPhyを添加したリノール酸メチルを30℃、暗所下で酸化を行なった結果、Fig. 6に示すように、光存在下の場合と全く異なり、ChlおよびPhyの両者ともリノール酸メチルの

酸化を抑制した。特に Chl a は最も強い抗酸化作用を示したが、高温では Chl の抗酸化作用は減少した。一方、トリグリセリドを基質油とした場合、Chl に抗酸化作用が認められたものの、Phy の抗酸化作用は観察されなかった。(Table 4) 以上の結果より、Chl 類の抗酸化作用は、基質の種類や酸化温度に依存することが明らかになった。

Chl の抗酸化作用の機構を明らかにするため、Chl のフリーラジカル還元力やヒドロペルオキシド分解能を調べた。その結果、Chl にフリーラジカル還元力の有することが認められ、また Fig. 7 に示すように、ESR 測定においても Chl 添加による脂質ラジカルの減少が観察されたことから、Chl の抗酸化作用は、酸化の初期過程で生じる脂質ラジカルを捕捉して連鎖反応を停止させることによると推察された。また、Chl の酸化過程で π -カチオンラジカルが観察され、Chl の抗酸化作用の機構に関係があるのではないかと推察された。

一方、Chl の抗酸化作用におよぼす α -トコフェロールや β -カロチンの影響について調べた結果、 α -トコフェロールは、Chl の抗酸化作用に対し相乗作用を示すとともに Chl の分解を抑制したが、 β -カロチンは逆に暗所下では酸化促進作用を示し、結果として脂質過酸化物による Chl の分解を加速化して、Chl の抗酸化作用を減少させた。(Fig. 8)

第 4 章 油脂中における Chl の分解

リノール酸メチルおよびトリグリセリド中では、Chl は光酸化および自動酸化に対して非常に不安定で容易に分解した。(Fig. 9) 特に、Chl a は最も分解されやすかった。一方、Phy は、a, b とも酸化に対して安定であり、ほとんど分解が認められなかった。また Chl の酸化分解において、Chl から Phy への転換は認められず、Niewiadowski らが報告したトリグリセリドの自動酸化における Chl から Phy への変化は、油脂の自動酸化によるものではなく、あらかじめ油脂中に存在していた遊離脂肪酸の H^+ によると推察された。Chl は、酸化により大部分が酸化促進作用を有さない無色の化合物に分解されたが、一部は、ポルフィリン環に隣接する五員環の構造だけが Chl と異なるアロマ化合物に変化して、光増感活性を維持することが観察された。(Fig. 10)

第 5 章 食品モデル系における Chl 類の油脂の酸化 におよぼす影響

油脂を多く含む食品のモデルとしてエマルジョン系およびセルローズにリノール酸メチルを吸着させた乾燥食品モデル系の二つの系を用いて、光照射下における含有脂質の酸化におよぼす Chl および Phy の影響を検討した。その結果、Fig. 11 に示すようにエマルジョン系および乾

乾燥食品モデル系の両系において、Chl および Phy に光増感活性が認められた。特に乾燥食品モデル系においては、先の油脂系と同様に Phy に Chl 以上の強い酸化促進作用が観察された。一方、食品モデル系における活性酸素スクベンジャーの添加試験において、Chl および Phy の酸化促進作用に、 $^1\text{O}_2$ や $\cdot\text{OH}$ を含むフリーラジカルなどの活性酸素が関与していることが示された。

一般に、油脂系食品には脂質以外に炭水化物やタンパク質などが共存しているのが通常である。そこで次に、これらの化合物の Chl および Phy 光増感酸化におよぼす影響について、乾燥食品モデル系を用いて検討した。その結果、Chl および Phy の酸化促進作用に対するこれら食品成分の影響は、共存する炭水化物およびタンパク質の種類や性状に依存したが、一般にタンパク質の方が酸化抑制効果の強いことが観察された。(Table 5)

第 6 章 総 括 (Fig.12参照)

植物油脂中に存在する Chl 類と油脂の酸化安定性との関係について検討を行った結果、従来、食用油脂中に残存する緑色色素は Chl と考えられていたが、本研究により、緑色色素の主成分は Chl の分解物の一つである Phy (a および b) であることが明らかとなった。さらに Phy は Chl と同様に光増感活性を有することおよび Chl と比較して非常に安定であることから、実際の食用油脂中に残存するレベルでも、光存在下では油脂の酸化を促進することを明らかにした。以上の結果は、油脂の酸化安定性を考える上で酸化促進剤としての Phy の含量にも注意を払わなければならないことを示すものである。一方、暗所下では、Chl は抗酸化剤として作用して油脂の劣化を抑制するが、Chl は酸化安定性に劣り、また非常にわずかな光の照射でも $^1\text{O}_2$ を発生して油脂の酸化を促進するので、Chl や Phy は油脂から除去した方が良いと考えられる。そして、Chl および Phy による油脂の劣化を防止するためには、今後、Chl (Phy) 含量の少ない食用油脂の製造方法を開発すると共に、油脂を保存する際、光からの遮断や不活性ガス・脱酸素剤による容器内の酸素の除去などの配慮が必要である。

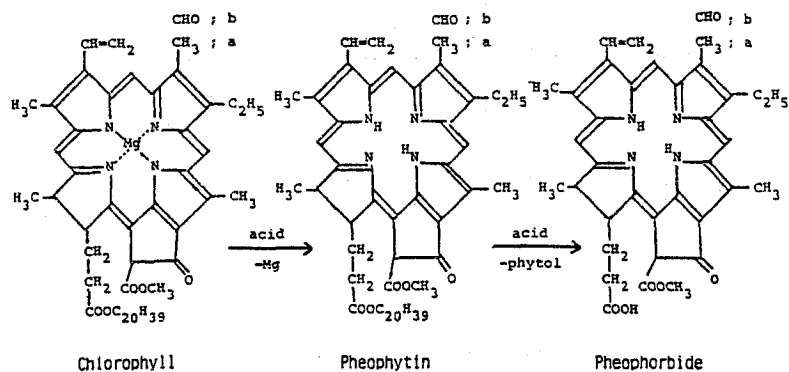


Fig. 1 The Structure of Chlorophylls, Pheophytins and Pheophorbides.

Column : NOVA-PAK Cartridge
 C_{18} (8 x 100mm)
 Mobile phase :
 acetone : methanol
 (75 : 25)
 Column pressure : 20 kg/cm²
 Flow rate : fluorescence
 (Ex 430 Em 650 nm)

Peak A : pheophytin b and b'
 B : pheophytin a
 C : pheophytin a'
 D : pyropheophytin a

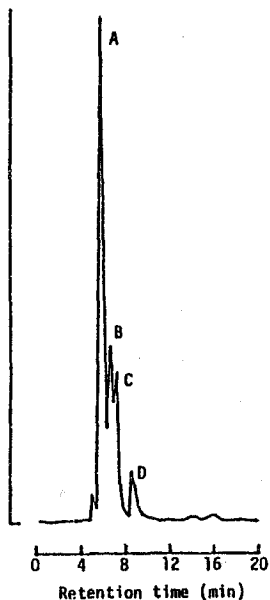


Fig. 2 High Performance Liquid Chromatogram of Chlorophyll Derivatives Isolated from Rapeseed Oil.

TABLE 1

Chlorophyll and Pheophytin Content of Several Refined Edible Oils in Japan

Oil	Manufacturer ^a	Total	CHL A	CHL B	PHY A	PHY B
<hr/>						
		<hr/>				
		μg/kg oil				
<hr/>						
Soybean	A	69.1	0.0	4.9	50.8	13.5
Soybean (S) ^b	B	66.7	3.9	2.7	44.7	15.5
Soybean (S)	B	65.4	3.6	2.8	44.0	15.0
Soybean (S)	B	116.0	2.0	13.3	73.1	27.7
Soybean (F) ^c	B	77.6	6.8	4.1	51.5	15.2
Soybean (F)	B	79.5	4.8	3.8	52.6	18.4
Soybean	C	57.0	0.0	0.3	49.3	7.4
Rapeseed	A	187.6	6.3	27.8	119.2	34.4
Rapeseed	A	180.2	3.6	21.4	107.5	47.7
Rapeseed	A	219.7	15.2	30.6	131.5	42.3
Rapeseed	B	126.0	4.0	11.3	83.5	27.1
Rapeseed	B	126.2	3.2	7.6	85.8	29.6
Rapeseed	B	132.0	3.4	7.4	90.0	31.2
Rapeseed	B	132.4	0.1	7.2	92.5	32.6
Rapeseed	C	154.0	0.2	11.9	92.1	49.8
Cottonseed	A	278.8	9.7	39.8	184.9	44.3
Cottonseed	C	213.9	0.0	10.3	168.7	35.5
Safflower	A	311.9	31.7	60.2	167.2	52.8
Safflower	C	114.8	0.8	16.7	82.4	14.8
Safflower	D	91.6	1.7	9.0	69.9	11.1
Safflower	D	131.9	9.2	11.7	96.0	15.0
Corn	A	161.7	0.0	18.9	114.4	40.5
Corn	B	101.4	2.2	12.0	73.5	13.6
Corn	B	95.4	2.7	10.1	68.5	14.2
Sunflower	B	146.1	8.3	23.1	88.8	25.7
Sunflower	B	160.0	11.0	26.9	95.6	26.5
Olive	E	142.0	7.7	16.9	97.0	20.6
Palm olein	A	582.9	30.3	113.8	341.2	97.6
Palm olein	A	579.4	15.3	106.4	359.3	98.5
Rice bran	F	626.0	29.6	79.5	396.7	120.3
Rice bran	F	533.0	25.8	63.7	368.7	74.8
Sesame	B	1189.5	125.1	318.9	542.8	202.7
Sesame	B	1324.7	162.6	338.9	562.3	310.9
<hr/>						
Mean compositional ratio ± SD (%)		4.1 ± 3.0	11.3 ± 6.0	65.7 ± 7.9	19.0 ± 4.7	

^aSame kinds of oil from same manufacturer were produced at different date.^bOils for salad use.^cOils for frying use.

TABLE 2

Effect of Light Intensity on the Autoxidation of Methyl Linoleate with Chlorophyll at 30°C.

		Peroxide value (meq/kg)		
		Oxidation time (hr)		
Light intensity (μW/cm ² sec)		24	48	72
0	None	13.4	25.0	130.1
	Chl ^a	12.4	15.8	19.3
1	None	14.3	25.5	128.5
	Chl ^a	14.2	23.2	96.4
10	None	15.8	80.2	302.8
	Chl ^a	24.7	86.6	298.5
100	None	83.7	389.3	-
	Chl ^a	111.5	449.3	-

^a addition level of Chl is 2.2×10^{-8} mol/g ML.

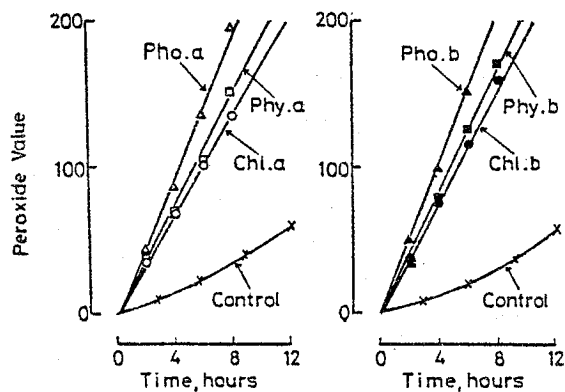


Fig. 3 Effects of Chlorophylls, Pheophytins and Pheophorbides on Photooxidation of Methyl Linoleate.
ML with Chl, Phy or Pho (2.2×10^{-8} mol/g) was irradiated with a fluorescent lamp ($500 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$) at 0°C .

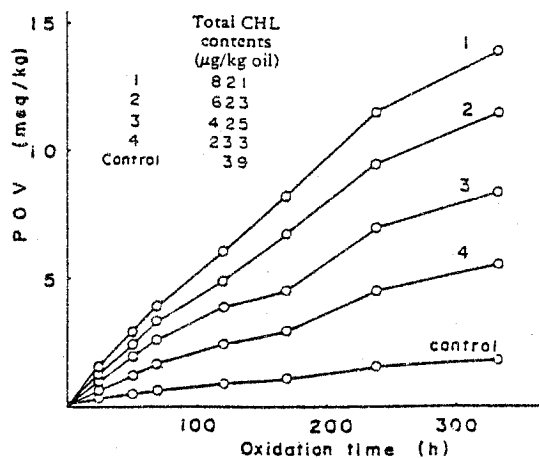
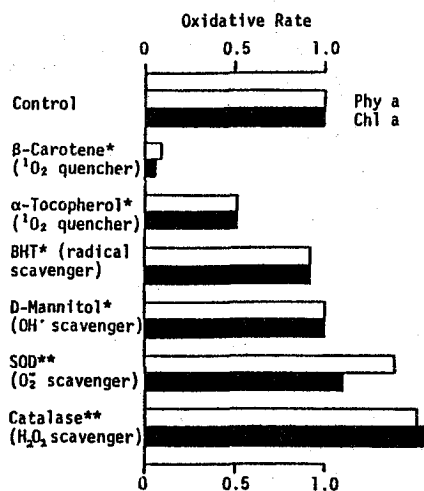


FIG. 4 Autooxidation of soybean oils under room light, to which various amounts of chlorophyll mixture (CHL A/CHL B/PHY A/PHY B = 1:3:10:3) were added.



* $2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ / (1.0g ML + $2.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ Chl a or Phy a)
 ** 2mg / (0.5g ML + 50mg Sodium Cholate + $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ Chl a or Phy a in 5ml of 0.1M Phosphate Buffer (PH 7.2))

Fig. 5 Effects of Free Radical and Active Oxygen Scavengers on Chlorophyll a-and/or Pheophytin a-Sensitized Photooxidation of Methyl Linoleate at 0°C.

TABLE 3
Effects of Chlorophyll Derivatives on the Composition of Positional Isomers of Monohydroperoxides Formed during the Photooxidation of Methyl Linoleate.

Additive	Isomeric Monohydroperoxides			
	Conjugated		Nonconjugated	
	9-OOH	13-OOH	10-OOH	12-OOH
None	+	+	-	-
Chlorophyll	+	+	+	+
Pheophytin	+	+	+	+
Pheophorbide	+	+	+	+
Protoporphyrin	+	+	+	+
Mg-Protoporphyrin	+	+	+	+
Pyrrole	+	+	-	-

+ : presence - : absence

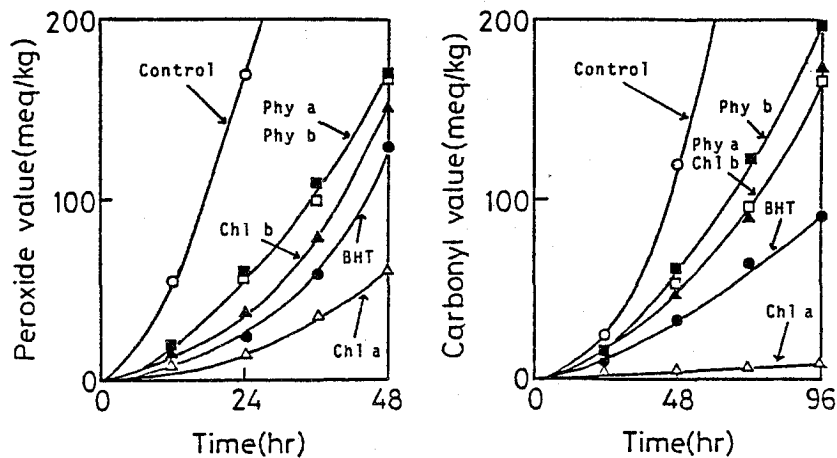


Fig. 6 Effects of Chlorophylls and Pheophytins on the Autoxidation of Methyl Linoleate in the Dark.
 2.2×10^{-8} mol of Chl, Phy or BHT was added to 1 g of ML, and was incubated at 30°C in the dark.

TABLE 4
 Effects of Chlorophylls and Pheophytins on the Autoxidation of Soybean and Rapeseed Oils at 30°C in the Dark.

Additives ^b	Induction period ^a	
	Soybean ^c	Rapeseed ^c
None	6	13
Chl a	12	17
Chl b	12	17
Phy a	5	13
Phy b	6	13
BHT	8	17

^a The days reached at 20 meq/kg in PV.

^b Addition level is 2.2×10^{-8} mol/g oil.

^c Initial PV of soybean and rapeseed oils are 1.3 and 1.5 meq/kg, respectively.

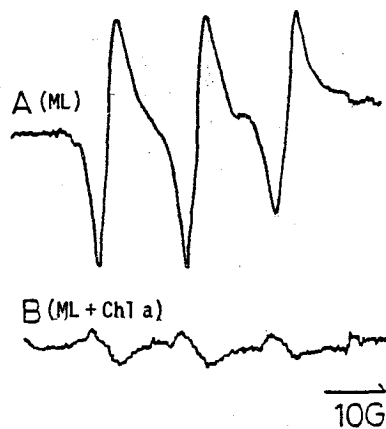


Fig. 7 ESR spectrum of Methyl Linoleate with Chlorophyll a in the Presence of PBN after Autoxidation.

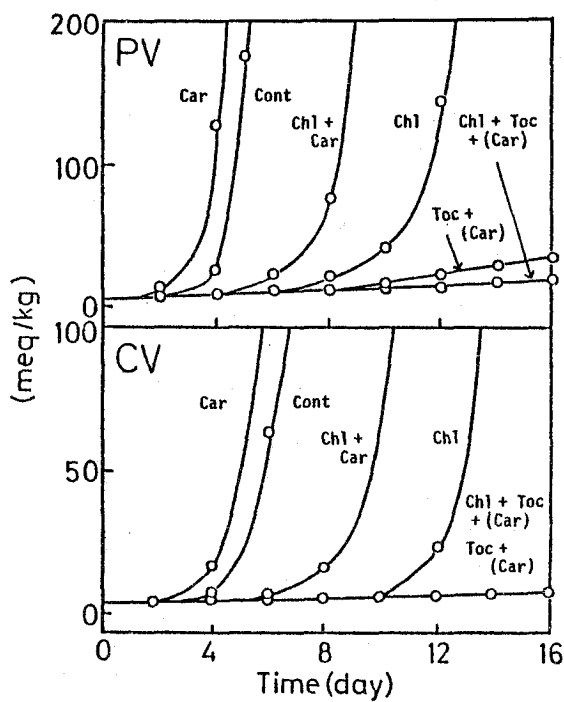


Fig. 8 The Autoxidation of Methyl Linoleate with Chlorophyll, α -Tocopherol and β -Carotene at 30°C in the Dark.
ML with Chl a, α -Toc and β -Car (10^{-7} mol/g) were incubated at 30°C in the dark.

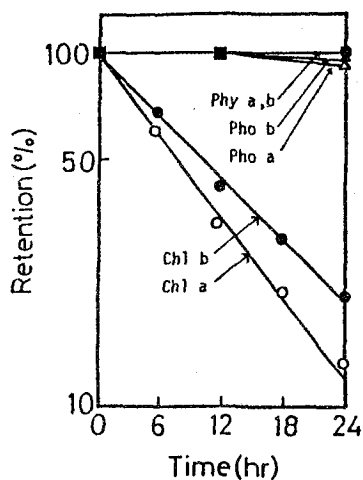


Fig. 9 The Degradation of Chlorophylls, Pheophytins and Pheophorbides during Photooxidation of Methyl Linoleate at 0°C.

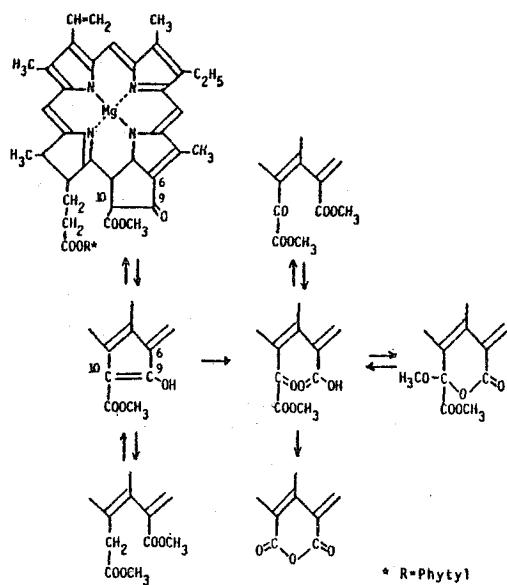


Fig. 10 Allomerization of Chlorophyll a.

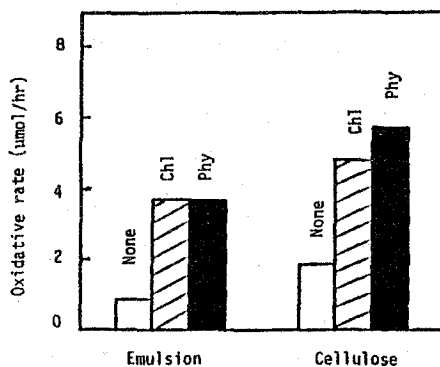


Fig. 11 Photooxidation of Methyl Linoleate with Chlorophyll and Pheophytin in Emulsion and Cellulose System.

ML with Chl a or Phy a (2.2×10^{-8} mol/g) was irradiated with a fluorescent lamp ($500 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \text{sec}$) in emulsion or cellulose system at 0°C.

TABLE 5
Photooxidation of Methyl Linoleate with Chlorophyll and Pheophytin in the Presence of Carbohydrates and Proteins.

Carbohydrates	PV (meq/kg) ^a		Proteins ^c	PV (meq/kg) ^a	
	Chl ^b	Phy ^b		Chl ^b	Phy ^b
Cellulose	132	244	Cellulose	117	177
Starch (Corn)	192	264	Milk Casein	90	143
Sucrose	288	316	Flour Protein	8	7
Glucose	300	307	Soybean Protein	44	71

^a PV is estimated after irradiation for 12hr.

^b Addition level of Chl a and Phy a is 2.2×10^{-7} mol/gML.

^c Cellulose contains 60% proteins.

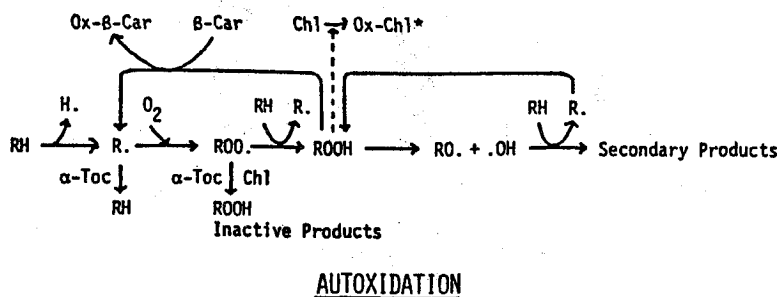
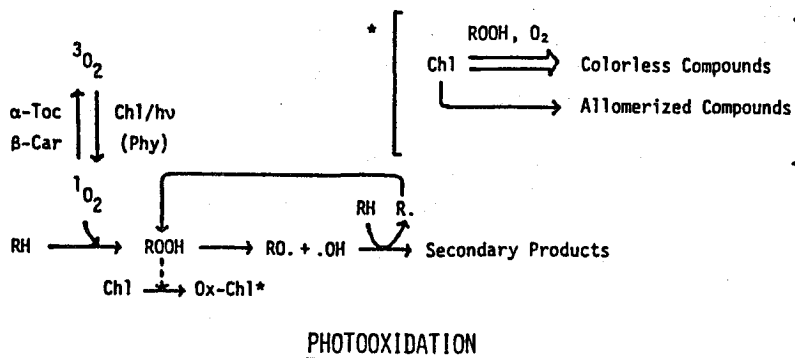


Fig. 12 Prooxidant and Antioxidant Effects of Chlorophyll on the Lipid Peroxidation.

審 査 結 果 の 要 旨

クロロフィル (CHL) は光合成を行なう植物に広く分布しており、光エネルギーを化学反応系に伝達する重要な役割を果たしていることがよく知られている。また CHL は野菜の鮮度や加工食品の品質を評価する上での指標とされ、新鮮な緑色を保持するのに苦心が払われている。一方、CHL は光増感作用を有し、一重項酸素を発生することにより、自動酸化とは異なった機構の酸化を引き起こすことが知られるようになってきた。元来、植物油脂には CHL が存在するので、もし精製食用油脂にも CHL が残存しているとすれば、その酸化安定性に影響している可能性がある。本研究は新たに考案された蛍光比色法により食用油脂中の CHL 関連物質の分析を行ない、諸条件下での油脂安定性への影響および CHL の分解について系統的な検討を行なったものである。

著者はまず食用植物油脂中の CHL 類の検索を行ない、その主成分が CHL から脱 Mg したフェオフィチン (PHY) であることを初めて明らかにし、CHL そのものは副成分で、光過敏症の原因となるフェオフィロールバイドは存在しないことを認めた。また、精製油脂中で PHY が主成分であるのは、油脂精製中に CHL → PHY の転換が起こるのではなく、ヘキサン抽出により PHY が選択的に抽出されることを明らかにした。

次に PHY および CHL は食用油脂中に認められる濃度 (約 200 $\mu\text{g/g}$ 油脂) でも光照射下では、光増感作用により酸化を著しく促進することを認めた。植物油脂中に共存するトコフェロールや β -カロチンはこの作用を弱めるが完全に抑えることはできなかった。

一方、CHL 類は暗所では逆に油脂の酸化安定性を高めるという特異な効果を認めた。これは脂質ラジカルの捕捉により、連鎖反応を停止するためであるとした。

また、CHL の油脂中での分解経路について検討、CHL は PHY を経ることなく主として無色の酸化促進作用を有さない分解物となり、一方 PHY は非常に安定で、酸化促進作用を長く持続することを認めた。また CHL 類の油脂酸化作用は油脂だけでなく、水分、糖質、たんぱく質が共存する食品モデル系でも観察された。

以上、本論文は食用植物油脂に残存するクロロフィル類の油脂酸化安定性への影響について詳細に検討し、食用油脂の製造ならびに保存性の向上について有効な知見をもたらしたものとして、審査員一同、学位を授与するに値すると判定した。